

Szegedi Tudományegyetem
Multidiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola

ATP-függő ion transzportok a biomembránban

Ph.D. értekezés tézisei

Ferencz Csilla-Mária

Témavezető
Dr. Páli Tibor

Magyar Tudományos Akadémia
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Biofizikai Intézet

Szeged

2012

Bevezetés

Jelentős azon tanulmányok száma, melyek az A-, F-, V- és P-típusú ATPáz családok megismerésére irányulnak. Ezek a fehérjék membrán-kötött ion transzporterek, amelyekben az ion transzportja ATP szintéziséhez és/vagy hidrolíziséhez kapcsolódik. Ezen enzimek működésének megismerése nagyban hozzájárulhat egyrészt a szervezet általános ion- és folyadékhomeosztázisát érintő szabályozó mechanizmusok, másrészt a kóros eltérések hátterében álló folyamatok azonosításához. Munkám során egy V-típusú vakuoláris proton-ATPázt (V-ATPáz), a P-ATPázok közül pedig cápából és sertésből származó Na,K-ATPázt vizsgáltam.

A V-ATPáz egy membrán-kötött molekuláris motor, egy ATP-függő proton pumpa, melynek mindkét doménje több alegységből épül fel. Az ATPáz aktivitásért a citoszolban elhelyezkedő V_1 katalitikus domén a felelős, a membrán-kötött V_o domén a proton átviteli folyamatokban vesz részt. A katalitikus domén forgása kapcsolja össze az ATP hidrolízist és a transzmembrán proton transzlokációt: egy ATP molekula hidrolíziséből felszabaduló energia stimulálja a rotor domén 120 fokos elfordulását bizonyos

alegységeken keresztül, aminek hatására két proton szállítódik a két domén határfelületén a V_1 domén felőli oldalról a membrán másik oldalára. A V-ATPáz fontos szerepet tölt be különböző sejtfunkciókban és betegségekben (pl. savasság biztosítása különböző szövetek sejtek közötti terében, úgymint csonttrikulásban, gyomorsav túltengésben vagy rosszindulatú daganatokban; valamint intracelluláris kamrákban, ahol a közeg pH-ja alacsonyabb, mint a citoplazmában). Emiatt szövetspecifikus gátlásának közvetlen orvosi és gyógyászati jelentősége lenne.

A V-ATPáz forgási mechanizmusának megértéséhez számos kísérleti adat áll rendelkezésre a szakirodalomban. A közvetlen mérések nagy részét azonban úgy végezték, hogy a fehérjén genetikai módosítások révén csatolási helyeket alakítottak ki, különböző fluoreszcens festékeknek vagy nano-részecskéknek a fehérjéhez való kötésére, valamint a fehérjének szilárd hordozón való rögzítésére. Így a forgás közvetlen megfigyeléséhez a módosított fehérjét natív környezetéből kiragadták, ezáltal megváltoztatva funkcionálitását. Vizsgálataink során kidolgoztunk egy új, *in situ* megközelítést a natív membránban működő V-ATPáz forgási sebességének méréséhez, melynek során oszcilláló

váltóáramú (AC) elektromos teret használtunk. Ez a megközelítés azon alapszik, hogy feltételezhető volt, hogy a váltakozó elektromos térből a V-ATPáz rotor doménjének forgása révén körbemozgó töltéssel rendelkező kémiai csoportok energiát tudnak kicsatolni, ami a rotor saját forgási frekvenciájának és az alkalmazott külső tér frekvenciájának egybeesése esetén segítheti, egyébként pedig gátolhatja a rotor forgását, és így növelheti-csökkentheti az ATPáz aktivitást. Módszerünk nem igényli a fehérje genetikai módosítását és nem szükséges jelzőmolekulák beépítése sem. Mint lejjebb látni fogjuk, feltételezésünk helyesnek bizonyult, és a külső AC tér segítségével meghatározható a V-ATPáz rotor doménjének forgási frekvenciája.

A Na,K-ATPáz a sejtek plazma membránjában található, és az intracelluláris homeosztázis fő szabályzója. A P-típusú ATPázok családjához tartozik, amely egy ATP molekula hidrolíziséből nyert energia árán, a hidrolízist kísérő konformációváltozás révén Na^+ iont pumpál a sejtől az extracelluláris térbe, miközben két K^+ iont juttat a sejt belsejébe. Így fontos szerepet tölt be a transzmembrán iongradiens szabályozásában, és ezáltal a sejtterefogat, a pH,

az akciós potenciál szabályozásában is. Munkánk során a Na,K-ATPáz stabilitását, és az azt befolyásoló tényezőket vizsgáltuk termikus denaturáció során, differencia pásztázó kalorimetria (DSC) mérésekkel.

A szerkezet és a funkció közötti kapcsolat tanulmányozása érdekében az alacsony hőmérsékleten élő cápa és a 37 °C-on élő sertés Na,K-ATPáz-ának aktivitását és stabilitását vizsgáltuk különböző típusú ionok és ionerősségek mellett.

Anyagok és módszerek

A V-ATPáz molekulákat élesztő sejtek (*Saccharomyces cerevisiae*) vakuólumában tanulmányoztuk. A vakuólumokat a sejtfal litikázos emésztéssel történő eltávolítása után ozmotikus sokkal feltört, homogenizált sejtekből sűrűség gradiens centrifugálással szeparáltuk. Ezután fluoreszcens-, illetve fagyasztva-töréses elektron-mikroszkópiával meghatároztuk a keletkezett membrán-vezikulák alakját és méretét. A vezikulákban levő V-ATPáz aktivitást az ATP hidrolízise során felszabaduló inorganikus foszfát (P_i) koncentrációjának meghatározásával mértük.

Rendszerünk működőképességét enzim aktivitás méréssel teszteltük különböző membrán fehérje inhibitorok jelenlétében. A *Concanamycin A* egy potens és specifikus gátlószere a V-ATPáznak, így a mérés során a jelenléte és hiánya közti P_i -koncentráció különbség megadja a tisztán a V-ATPázhoz rendelhető ATPáz aktivitást. Vezikulás preparátumainkban, a teljes ATPáz aktivitásnak mintegy 60%-kát a V-ATPáz adta.

A forgási mechanizmus vizsgálatához a membrán szuszpenzióra váltóáramú (AC) elektromos teret kapcsoltunk egy lapos küvettában, 4 mm távolságban lévő platina elektródák segítségével. Az aktivitás mérését elvégeztük $2\ \mu\text{M}$ *Concanamycin A* jelenlétében, illetve annak hiányában, 10 perces mérési idő és $20\ ^\circ\text{C}$ inkubálás mellett, valamint elektromos tér hatása alatt és annak hiányában (kontroll minták) is. Az elektródákra 15 V-os feszültséget kapcsoltunk.

A Na,K-ATPáz enzim tisztítása cápa (*Squalus acanthias*) mirigyből, illetve sertés vese mikroszómális membránokból történt A Na,K-ATPáz aktivitását standard kémiai módszerrel, szintén a keletkezett inorganikus foszfát (P_i) koncentrációjának kolorimetriás mérésével határoztuk

meg, *ouabain* (az enzim specifikus inhibitora) jelenlétében, illetve annak hiányában. A Na,K-ATPázban dús membrán preparátumainkban az enzim tisztasága kb. 70% -os volt. A membránfehérjék termikus stabilitását egy VP-DSC típusú kaloriméterrel (Microcal LLC, Northampton, MA) vizsgáltuk. A mérés előtt minden mintát 4 °C-on 2h centrifugálással töményítettünk. A minták stabilitását 1, vagy 20 mM hisztidin, 10 mM NaCl, illetve ezek együttes jelenléte esetén is megmértük. A mintákat 1 °C/min sebességgel mértük, 5 °C-tól 95 °C-ig. A hőmérséklet pásztázása előtt a minták termikus egyensúly beállítására 30 percet hagytunk. A műszer alapvonalát minden esetben azonos körülmények között rögzítettük (a minta pufferének ömagával szemben mért profilja). Ezeket később levontuk a minták hőkapacitási profiljából. A DSC endotermekből meghatároztuk a teljes átmenethez (denaturációhoz) valamint az egyes komponensekhez tartozó középponti hőmérsékleteket (T_d) és entalpiákat (ΔH_d).

Eredmények és diszkusszió

Megállapítottuk, hogy az oszcilláló (AC) elektromos tér jelenléte a V-ATPáz aktivitását széles frekvencia intervallumon keresztül gyengíti, kivéve egy szűk tartományt, ahol a jel eléri vagy meghaladja a kontrol szintjét. Ez a rezonancia jellegű effektus először 88.3 Hz-nél volt mérhető, de különböző preparátumokban 87 és 94 Hz között ingadozott. Sikerült bebizonyítanunk, hogy ez az effektus összefüggésben van a transzmembrán potenciállal: a membránon pórusokat képező FCCP (carbonyl cyanide-p-(trifluoromethoxy)-phenilhydrazone) illetve *Gramicidin A* hozzáadására kioltódik a transzmembrán potenciál, és ennek hatására eltűnt a V-ATPáz aktivitásának rezonancia csúcsa is, a nem rezonáló ATPáz aktivitásból származó háttér-jel azonban megmaradt. A V-ATPáz forgási mechanizmusának jelenleg érvényes modellje alapján a rezonancia frekvencia a rotor 60 fokos elfordulása frekvenciájának felel meg, aminek hatoda a teljes ciklus frekvenciája. Megbecsültük az enzim forgási sebességét aktivitás mérésekből is. Fotometriásan meghatároztuk a 10 perc reakció idő alatt felszabaduló inorganikus foszfát (P_i) koncentrációját. A

becsléshez szükséges aktív V-ATPáz koncentrációját a specifikus gátlószer (*Concanamycin A*) titrálási görbéjéből származtattuk, és felhasználtuk az ismert adatokat, miszerint egy teljes forgási ciklus alatt 3 ATP hidrolizise megy végbe minden V-ATPáz molekula esetén. Az adatok szerint a teljes ciklus frekvenciája ~ 10 Hz, amely alsó becslés. A mérési hibákat tekintve, valamint azt, hogy a gátlóanyag és a natív enzim aktivitását nem ismerjük, ez az alsó becslés nagyon jó egyezést jelent a fenti rezonancia frekvenciával.

Megfigyeléseink magyarázata az, hogy az oszcilláló (AC) elektromos tér befolyásolja a proton transzmembrán mozgását. Ha figyelembe vesszük az *a* és *c* alegységek közötti hidrophil proton csatorna és a proton kötőhely geometriáját, belátható, hogy a forgásnak vannak olyan fázisai, amikor a proton végez illetve nem végez a membrán normálisa menti mozgást. Ha e fázisok ideje összehasonlítható, akkor megfelelő AC frekvencia nem gátolja a proton transzlokációt, sőt elősegítheti azt, míg túl alacsony vagy túl magas AC frekvencia gátolja.

A köztük levő magas homológia ellenére lényeges különbségeket találtunk a két különböző eredetű Na,K-ATPáz enzim stabilitása és termikus denaturációs

viselkedése között. A sertés vese enzim aktivitása megmarad magasabb hőmérsékleteken is, ennek megfelelően stabilitása kevésbé függ a centrifugálástól és az alacsony ionerősségtől. A cápa enzim könnyen inaktiválódik a hőmérséklet emelésére, centrifugálásra és alacsony ionerősségek mellett.

A többkomponensű denaturációs DSC endotermekben a komponensek valószínűleg különböző doméneknek felelnek meg, melyek viszonylag önállóan tekerednek ki (főként a cápa enzim esetén). Ezeknek a pontos beazonosítására a jelen eredmények nem elegendők, de mivel az intra-membrán régióban a hélixeket erős hidrogénhidak kötik össze, a látható endotermek főként a membránból kilógó fehérje részeknek tulajdoníthatóak.

Tekintettel arra, hogy közreműködő partnereink vizsgálataiból tudjuk, hogy ezeknek az enzimeknek aktivitási optima megfelel annak a fiziológiás hőmérséklet tartománynak, ahol a cápa, illetve a sertés él, az általunk talált stabilitási profilok azt mutatják, hogy azonos biokémiai funkciót végző fehérjéket és környezetüket úgy alakította ki az evolúció, hogy működésük optimális legyen az adott fizikai feltételek mellett. Jóllehet esetünkben

membrán-kötött fehérjékről van szó, kalorimetriás méréseink a teljesen a vizes fázisban elhelyezkedő fehérje szakaszok termikus adaptációját mutatják. Ez nem magyarázható a cápa és sertés membránok összetételének különbségével és a biomembránok homeoviszkozus adaptációjának ismert jelenségével, hiszen az evolúciónak nincs befolyása a víz szerkezetének és dinamikájának hőmérsékletfüggésére, aminek pedig jelentős szerepe van a fehérjék stabilitásában. Ezért meglepő, hogy a szekvenciában mutatkozó magas homológia ellenére a vizes fázisban elhelyezkedő fehérje szakaszok termikus stabilitása is adaptálódott.

Az értekezés alapjául szolgáló publikációk:

1. **C. Ferencz**, P. Petrovszki, Z. Kóta, E. Fodor-Ayaydin, L. Haracska, A. Bóta, Z. Varga, A. Dér, D. Marsh, T. Páli, Estimating the Rotation Rate in the Vacuolar Proton-ATPase in Native Yeast Vacuolar Membranes, *European Biophysics Journal*, (*in press*, DOI: 10.1007/s00249-012-0871-z) (2011). **IF: 2.14**
2. E. Fodor, NU. Fedosova, **C. Ferencz**, D. Marsh, T. Pali, M. Esmann, Stabilization of Na,K-ATPase by ionic interactions. *BBA- Biomembr.*, 1778, 835-843 (2008). **IF: 4.11**

Posztterek és előadások

Fodor, E., Fedosova, N., Ferencz, C., Tokaji, Zs., Kóta, Z., Esmann, M., Marsh, D. and Páli, T.: Membrán fehérjék termikus stabilitása, Magyar Biofizikai Társaság XXIII. Kongresszusa, Pécs, 2009 (poszter)

Ferencz, C., Páli T.: V-ATPase – a membrane-bound molecular rotary engine, Straub napok, Szeged, 2010 (előadás)

Ferencz, C., Páli T.: Egy biomembránban működő molekuláris motor, a vakuoláris proton-ATPáz forgási mechanizmusa, 41. Membrán-transzport konferencia, Sümeg, 2011 (előadás)

Ferencz, C., Petrovszki, P., Kóta, Z., Fodor, E., Dér, A., Haracska, L., Ayaydin, F., Varga, Z., Bóta, A., Marsh, D., and Páli, T.: The rotary mechanism of a molecular engine, the vacuolar proton-ATPase,

working in a biomembrane, 8. Europai Biofizikai
Kongresszus, Budapest, 2011 (poszter)